Die Gewinnung von Neuraminidase aus dem Virus der Atypischen Geflügelpest

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Beatriz Gómez
Montemorelos N. L. Mexico

1962

7134

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549607_0050

Die Gewinnung von Neuraminidase aus dem Virus der Atypischen Geflügelpest

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Beatriz Gómez

Montemorelos N.L. Mexico

1962

Tag der mündlichen Prüfung: 15.Februar 1962

Dekan: Prof. Dr. W. Braunbeck

1. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Schramm

2. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Weitzel

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.Gerhard Schramm in der Zeit von Februar 1959 bis Mai 1961 am Max-Planck-Institut für Virusforschung durchgeführt.

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr.G.Schramm danke ich herzlichst für die wertvollen Anregungen und die ideelle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Charakterisierung der Neuraminidase aus Vibrio cholerae.	6
1.) Darstellung und Bestimmung des Enzyms. .	6
2.) Ionenbedarf.	7
3.) pH-Stabilität des Enzyms	8
4.) Stabilität gegen verschiedene chemische Agentien	9
a) Harnstoff	9
b) Thioglycol.	10
5.) Stabilität gegen verschiedene Enzyme . .	11
III. Versuche zur Abspaltung der Neuraminidase aus dem Virus bzw. dem Hämagglutinin der Atypischen Geflügelpest.	14
1.) Nachweis des abgespaltenen Enzyms in Gegenwart von Virus und Virusbestandteilen	14
a) Ultrazentrifugation	15
b) Ultrafiltration	15
2.) Abspaltungsversuche.	16
a) Physikalische Abspaltungsversuche . .	16
b) Durch Chemikalien	17
α) Alkali	17
ß) Harnstoff.	17
γ) Thioglycol	20
) Perjodat	22
) Phenol	23
c) durch Enzyme.	24
α) Lysozym und Hydrolasen	24
ß) Trypsin.	24
d) durch oberflächenaktive Stoffe. . . .	26

Seite

IV. Versuche zur Anreicherung der abgespaltenen Neuraminidase 28

1.) Säulenchromatographie des Atypischen-Geflügelpest-Virus und des Virus-Hämagglutinins 29

2.) Säulenchromatographie von Virusneuraminidase nach Trypsinspaltung 30

a) mit Tween abgespalten 31

V. Vorläufige Versuche zur Charakterisierung der Neuraminidase aus Atypischem Geflügelpest-Virus. 32

1.) pH-Abhängigkeit 33

2.) Temperatur-Abhängigkeit 33

3.) Konzentrationsabhängigkeit. 33

VI. Methoden 34

1.) Präparation von Neuraminidase aus Vibrio cholerae 34

2.) Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität 34

3.) Darstellung der Stromata. 34

4.) Behandlung von Neuraminidase, Hämagglurinin und Atypischem Geflügelpest-Virus mit Thioglycol. 36

5.) Darstellung von Atypischem Geflügelpest-Virus. 37

6.) Darstellung des Hämagglutinins. . . . 37

7.) Bestimmung der Hämagglutinationsaktivität 38

8.) Bestimmung der Virusinfektiosität . . 38

9.) Ultrafiltration und Ultrazentrifugation 39

10.) Säulenchromatographie 39

11.) Stickstoffbestimmung. 41

Zusammenfassung 42

Einleitung

Das Enzym Neuraminidase ist Bestandteil einer Reihe von Viren und ist ferner in Mikroorganismen enthalten, die im Darm und in den Atmungswegen vorzufinden sind. Sein Name ist auf seine Fähigkeit zurückzuführen, Neuraminsäure bzw. deren Acylderivate aus biologischen Materialien abzuspalten. Da die Acylderivate der Neuraminsäure auch als Sialinsäuren bezeichnet werden, ist auch der Name Sialidase für das Enzym gebräuchlich. Die Neuraminidase-haltigen Viren gehören alle zu der Gruppe der sogenannten Myxoviren, die das Influenza-Virus, das Virus der Klassischen- (Fowl plague) und der Atypischen Geflügelpest (Newcastle disease) und das Mumpsvirus umfasst. Allen diesen Viren ist die Fähigkeit gemeinsam, in der Kälte sich an rote Blutkörperchen zu adsorbieren. Die Viruspartikel vernetzen dabei die Erythrocyten, was sich makroskopisch durch eine Verklumpung bemerkbar macht. Diesen Vorgang bezeichnet man deshalb auch als Hämagglutination. Er ist reversibel, weil bei schwach erhöhter Temperatur (37°C) die Viruspartikel wieder von den Erythrocyten spontan abgelöst werden. Allerdings sind nach der Viruselution die Erythrocyten durch Zugabe von neuem Virus in der Kälte nicht mehr zur Agglutination zu bringen.

Hirst (1942 a und b), dem hauptsächlich die Aufklärung dieses Phänomens zu verdanken ist, interpretierte die spontane Elution der Viruspartikel als eine Enzym-Substrat-

Wechselwirkung. Danach besitzt die Erythrocytenoberfläche das Substrat in Form eines "Receptors", mit dem sich das Enzym des Virus in der Kälte verbindet. In der Wärme wird dann der Receptor abgespalten. Das Virus behält seine enzymatische Aktivität unverändert bei.

Im Einklang mit Hirsts Deutung stehen folgende Befunde: Myxoviren, die 3o Minuten auf 56°C erwärmt wurden, können sich wohl noch an die Erythrocyten adsorbieren, lassen sich aber dann nicht mehr eluieren, weil durch die Hitzebehandlung ihre enzymatische Aktivität zerstört wurde. Ferner zeigen Mucine verschiedenster Herkunft, die denselben Receptor besitzen wie die Erythrocyten, eine hemmende Wirkung auf die Virushämagglutination (Gottschalk, Lind 1949).

Der Vorgang der Hämagglutination lässt sich gut verstehen, wenn man annimmt, dass das Enzym an der Oberfläche des Virus gebunden vorkommt. Dies ist inzwischen durch Strukturuntersuchungen einiger Myxoviren, die hauptsächlich von Schäfer und Mitarbeitern durchgeführt wurden, deutlich gemacht worden (siehe Schäfer, 1959). Danach enthalten diese Viren, bei denen die Fähigkeit zur Hämagglutination fest mit ihrer Infektiosität verbunden ist, im wesentlichen zwei Bestandteile: das sogenannte "gebundene Antigen", ein Nucleoproteid, das sich im Innern des Virus befindet, und das Hämagglutinin, ein Glycoproteid, welches das Antigen umgibt. Das ganze Virus ist durch eine Lipidmembran geschützt. Durch Spaltung mit Äther lassen sich "gebundenes Antigen"

und Hämagglutinin trennen (Hoyle 1952). Es konnte nun zuerst bei dem Influenzavirus und dem Virus der Klassischen Geflügelpest (Schäfer, Zillig 1954), neuerdings auch bei dem Virus der Atypischen Geflügelpest (Rott 1961) gezeigt werden, dass die Enzymaktivität an das Hämagglutinin gebunden ist.

Die biologische Funktion des Enzyms in den Viren ist noch nicht sicher, vielleicht wirkt es mit bei Eintritt oder Austritt des Virus in bzw. aus der Zelle.

In die Wirkungsweise des Virusenzyms erhielt man näheren Einblick dadurch, dass es gelang, aus Kulturfiltration von Mikroorganismen (Clostridium welchii und Vibrio cholerae) ein Enzym zu isolieren, welches auch in der Lage war, den Virusreceptor der Erythrocyten abzuspalten. Wegen dieser Fähigkeit wurde es "receptor destroying enzyme" (RDE) genannt. (Eine zusammenfassende Darstellung siehe bei Gottschalk, 1960). Auch wenn man die die Virushämagglutination hemmenden Mucine mit diesem Enzym behandelte, konnte die Inhibitorwirkung aufgehöben werden. Faillard (1957) konnte zeigen, dass dieser Verlust der Hemmwirkung auf die Abspaltung von N-Acetylneuraminsäure aus den Mucinen zurückzuführen ist. Das RDE erhielt deshalb den Namen Neuraminidase. Im weiteren Verlauf der Arbeit soll es als Cholera-Neuraminidase bezeichnet werden. Kuhn und Brossmer (1958) identifizierten dieses Enzym als eine α-O-Glycosidase, welches die ketosidische Bindung der Neuraminsäure an verschiedene Zucker in den Mucoproteinen löst.

Die Reindarstellung und Kristallisation der Neuraminidase aus Cholera-Vibrionen gelang unabhängig voneinander,

Schramm und Mohr (1959) und Ada und French (1959). Die ersten Autoren machten dabei von der spezifischen Bindung des Enzyms an sein Substrat Gebrauch. In einer Säule aus Kieselgur, welches mit Erythrocytenstromata gemischt war, wurde das RDE in der Kälte adsorbiert, so dass verunreinigende Begleitproteine ausgewaschen werden konnten. Danach wurde das Enzym in der Wärme eluiert.

Nach den Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge hat das Enzymprotein ein Molekulargewicht von 10 - 20 000. Es ist in reiner Form sehr instabil; durch Zusatz von Serumalbumin, Cyanidionen oder chelatbildenden Agenzien kann die Enzymaktivität stabilisiert werden.

Die Neuraminidase der Myxoviren ist bis heute noch nicht näher charakterisiert worden. So wissen wir noch nicht, ob es sich bei ihr um ein echtes Enzymprotein handelt, welches in Grösse und Struktur vergleichbar ist mit anderen schon bekannten Enzymen. Lediglich seine Substratspezifität und Wirkungsweise, die es mit dem Cholera-Enzym gemeinsam hat, lässt vermuten, dass es auch als Proteinmolekül dem Cholera-Enzym gleich oder ähnlich ist.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es daher sein, die Neuraminidase von einem Myxovirus abzuspalten und so weit wie möglich mit der Cholera-Neuraminidase zu vergleichen. Als Objekt der Untersuchung wurde das Virus der Atypischen Geflügelpest verwendet, weil dieses von allen Myxoviren die höchste Neuraminidase-Aktivität besitzt.

In Vorversuchen wurde zunächst die leichter zugängliche

Neuraminidase aus Vibrio cholerae verschiedenen chemischen und enzymatischen Behandlungen ausgesetzt, die später für die Abspaltung des Virusenzyms in Frage kommen sollten. Es wurde eine Reihe von physikalischen, chemischen und enzymatischen Methoden geprüft, aber dann nur solche auf das Virusenzym angewandt, die die Aktivität nicht oder zumindest nicht wesentlich beeinträchtigen. Auf diese Weise konnte Virusmaterial gespart werden, dessen Reindarstellung sehr kostspielig ist. Nach vielen negativen Versuchen gelang es schliesslich, das Enzym vom Virus abzutrennen und anzureichern.

II. Charakterisierung der Neuraminidase aus Vibrio cholerae

1.) Darstellung und Bestimmung des Enzyms

Für die Vorversuche wurde ein Präparat von Neuraminidase aus Vibrio cholerae verwandt. Hierzu wurde das Enzym aus Cholera-Rohfiltrat nach dem Verfahren von Ada und French (1950) durch Adsorption an Erythrocyten bei 0°C und Elution bei 37°C pH 5,5 gewonnen. Auf eine weitere Reinigung des Präparats wurde absichtlich verzichtet, da hochgereinigte Präparate sich als sehr instabil erwiesen. Das Rohenzym wurde verschiedenen Behandlungen unterworfen; dabei wurde geprüft, wieweit es sich als stabil erweist, um festzustellen, ob diese Verfahren zur Abspaltung des Virusenzyms aus der Atypischen Geflügelpest in Frage kommen könnten. Auch sollten die Eigenschaften der Cholera-Neuraminidase weiter aufgeklärt werden, um später eventuell einen Vergleich mit denen der Virus-Neuraminidase durchführen zu können.
Die Neuraminidase-Aktivität wurde nach Schramm und Mohr bestimmt, das Verfahren, das auf der Abspaltung von Neuraminsäure aus einem Mucopolysaccharid-Substrat besteht, wurde nur leicht abgeändert. Als eine Enzymeinheit E wird diejenige Enzymmenge definiert, die in 15 min bei 37°C 1 γ Neuraminsäure abspaltet.
Das Mucopolysaccharid-Substrat bestand aus Rindererythrocy ten-Stromata, die in gleicher Weise wie die von Mohr benützten Hammelerythrocytenstroma hergestellt wurden. Die Verwendung der Rindererythrocyten-Stromata als Substrat anstelle von Harnmucin bietet manche Vorteile. Zunächst sind

die Stromata leicht zu präparieren. Ferner zeigt die Kurve der je Enzymeinheit abgespaltenen Neuraminsäuremenge in Abhängigkeit vom pH ein breiteres Maximum. Kleine Schwankungen des pH würden also die Bestimmung der Enzymaktivität bei Stromata als Substrat kaum beeinflussen. Weiterhin wurden verschiedene Puffer auf ihre Eignung für die Abspaltungsversuche geprüft. In Maleinat und Trismaleinat war die abgespaltene Menge an Neuraminsäure relativ am höchsten, das pH wurde auf 6,4 gehalten.

2.) Ionenbedarf des Enzyms

Durch Dialyse gegen 10^{-3}m Versenat und mehrfache Dialyse gegen destilliertes Wasser in der Kälte konnten aus Cholera-Neuraminidase wie aus dem Substrat die Ionen entfernt werden. Unter diesen Bedingungen hatte das Enzym keine Wirkung mehr. Durch verschiedene Ionen, z.B. Ca, MG, Man lässt sich die Enzymaktivität regenerieren. Durch 0,001 m $CaCl_2$ oder $MnCl_2$ konnte die ursprüngliche Aktivität vollkommen wieder erreicht werden, durch 0,01 m $MgCl_2$ dagegen nur zu 65%. Ähnliche Ergebnisse erhielten Rosenberg et al. (1960) mit Ca, Mg und Co. Siehe Tabelle 1.

Tabelle 1

Regeneration der Neuraminidase-Aktivität bei Zugabe verschiedener Ionen (in Prozenten der Ausgangsaktivität).

Ionenkonzentration		Ca	Mg	Mn	Na
0,01	m	100	64	100	0
0,005	m	100	64	100	0
0,001	m	100	-	-	-
0,0001	m	1	-	-	-

Die Ausgangsaktivität betrug 530 E/ml

3.) pH-Stabilität des Enzyms

Um die Stabilität des Enzyms bei verschiedenem pH zu prüfen, wurde das Enzympräparat einmal gegen 0,1 m Borsäure-Soda-Puffer von verschiedenem pH 3 Stunden dialysiert, oder 0,5 ml der Enzymlösung wurden mit 1 ml Maleinatpuffer 0,1 m von verschiedenem Ph versetzt. Das endgültige pH der Enzyme nach Dialyse bzw. Pufferzugabe wurde mit dem pH-Meter gemessen. Tabelle 2 kann man entnehmen, dass das Enzym gegen schwache Säure sehr empfindlich ist. Aber auch im schwach alkalischen Bereich nimmt die Aktivität allmählich ab. Am stabilsten ist die Aktivität im pH-Bereich 6,5 - 9.

Tabelle 2a

Neuraminidase-Beständigkeit bei verschiedenem pH

Zeit	pH					
	7,0	8,41	9,21	9,9	10,1	10,4
0	100%	100%	100%	90%	82%	65%
3 Std.	100	100	100	82	66	45
16 Std.	100	100	100	80	62	34

Die Ausgangsaktivität des Enzyms betrug 365 E/ml.

Tabelle 2b

Zeit	pH			
	2,5	4,8	6,1	7,2
0	0	80%	100%	100%
4 Std.	0	65	88	100
16 Std.	0	23	70	100
24 Std.	0	20	50	100

Die Ausgangsaktivität des Enzyms betrug 365 E/ml.

4.) Stabilität gegen verschiedene chemische Agentien

a) Es wurde geprüft, ob die Enzymaktivität durch Wasserstoffbrücken spaltende Agentien zu beeinflussen war; zu diesem Zweck wurde zu einer Enzymlösung soviel Harnstoff gegeben, dass sie dann 6 bzw. 8 und 10 m an Harnstoff war, und 3o min. auf 20 bzw. 0°C gehalten. Dann wurde der Harnstoff in der Kälte durch Dialyse gegen 0,025 m Phosphat-

puffer vom pH 6,5 mit Zusatz von 0,001 m Cyanid entfernt, Die Behandlung mit 6 m Harnstoff bewirkte eine geringe, die mit 8 m Harnstoff eine Abnahme der Enzymaktivität um 35 %, 10 m Harnstoff um über 50%.

Tabelle 3

Einwirkung von Harnstoff bei 20°C auf Neuraminidase

	pH	E/ml vor Behandl.	E/ml nach Behandl.	%
10 m Harnstoff 10 min.	7,8	280	125	45
8 m Harnstoff 30 min.	8,5	125	80	64
6 m Harnstoff 30 min.	8,5	125	108	86

b) Ferner wurde untersucht, ob die Neuraminidase-Aktivität durch Disulfidbrücken spaltende Agentien zerstört werden konnte. Bei Ribonuclease war es nämlich möglich, durch Thioglycol und Cystein die Disulfidbrücken zu spalten und die Aktivität zu vernichten. Zugabe von Harnstoff erleichterte die Spaltung. Durch Belüftung konnte die Aktivität vollkommen regneriert werden, die Spaltung der Disulfidbrücken verläuft also bei der Ribonuclease reversibel (S.Michael (1957)). White (1960) wies darauf hin, dass das Thioglycol frei von Polymeren sein muss, da diese sich an das Restpeptid anlagern und dann keine vollständige Regeneration der Aktivität mehr möglich ist.

Bei der Neuraminidase wurde ebenfalls Thioglycol verwandt, das durch Vakuumdestillation gereinigt wurde. In Gegenwart von 6 m Harnstoff wurden 50 γ/ml Thioglycol zugesetzt. Bei Zimmertemperatur nahm dann die Aktivität innerhalb von 30 min. um 50 % ab. Durch Belüftung über 10 min. konnte jedoch der Aktivitätsverlust nicht wieder rückgängig gemacht werden.

Tabelle 4

Einwirkung von Thioglycol, 50 γ/ml, auf Neuraminidase bei 20°C über 30 min.

Bedingungen	pH	E/ml vor Behandl.	E/ml nach Behandl.	%
6 m Harnstoff	8,62	125	67	62,5
nach 5' Belüftung	8,62	125	42,9	29,5
Kontrolle ohne Harnstoff	8,6	220	75	34
nach 5' Belüftung	8,6	220	27,3	13
Kontrolle mit Harnstoff ohne Thioglycol	8,4	176	132,5	85
Kontrolle nur Belüftung	8,4			

5.) Stabilität gegen verschiedene Enzyme

Von Stone (1949) war gefunden worden, dass Cholera-Neuraminidase sowohl in verdünnter wie in konzentrierter Trypsin-Lösung nach 2 Stunden Inkubation vollkommen inaktiviert wird. Diese Versuche wurden wiederholt. Die Aktivität eines

reinen Neuraminidase-Präparates (spez.Aktivität 1000) sank unter Einwirkung von Trypsin in einer Stunde auf 20 %, während die des Kontrollpräparats ohne Trypsineinwirkung in der gleichen Zeit um 50 % abnahm. Ein unreines Neuraminidase-Präparat erwies sich als wesentlich stabiler, die Aktivität nahm innerhalb 9 Stunden nur um 20 % ab. Ferner wurde das Neuraminidase-Präparat der Wirkung von Chymotrypsin und Hydrolasen ausgesetzt. Beide Enzyme zeigen eine dem Trypsin ähnliche Wirkung (siehe Tabelle 5). Bei Einwirkung von Lysozym sank die Neuraminidaseaktivität innerhalb 40 min. gar nicht ab. Die Wirkung von Papain, das innerhalb weniger Minuten die Neuraminidase vollständig inaktivierte, beruhte daher wahrscheinlich auf Verunreinigungen in diesem Enzympräparat.

Zusammenfassend lässt sich also über die Eigenschaften der Neuraminidase aus Cholera-Vibrionen kurz folgendes sagen: Zu seiner Wirkung bedarf das Enzym zweiwertiger Ionen, z.B. Ca^{++}. Es ist im pH-Bereich von 6-9 beständig, dagegen im sauren Bereich sehr unbeständig. Gegen Reagentien, die Wasserstoffbrücken spalten oder Disulfidbrücken reduzieren, wie Harnstoff und Thioglycol, ist das Enzym relativ beständig, ebenso gegen tryptische Enzyme.

Tabelle 5

Einwirkung verschiedener Enzyme auf Neuraminidase aus Vibrio Cholerae

a) Trypsin und Chymotrypsin (je 100 γ/ml) bei 37°C in 0,05 m Phosphatpuffer vom pH 7,5

Neuraminidase-N/Enzym-N = 100/30.

Zeit	Kontrolle		Trypsin		Chymotrypsin	
Ausgangszeit	E/ml	%	E/ml	%	E/ml	%
	290	100	280	92	250	86
0,5 Stdn.	290	100	280	92	250	86
1,5 Stdn.	290	100	280	92	220	76
4,5 Stdn.	290	100	280	92	205	71
9 Stdn.	235	81	195	67	155	53,5
22 Stdn.	113	43	38	13		

b) Lysozym und Hydrolasen-Gemisch bei 37°C in 0,05 m Phosphatpuffer vom pH 7,5. (50 γ/ml Enzymkonzentration bei Lysozym, bei Hydrolasen 100 γ/ml).

Zeit	Kontrolle		Lysozym		Hydrolasen	
Ausgangszeit	E/ml	%	E/ml	%	E/ml	%
	200	100	200	100	200	100
10 min.	200	100	200	100		
20 min.	200	100	200	100		
40 min.	200	100	200	100		
1 Std.					70	35

III. Versuche zur Abspaltung der Neuraminidase aus dem Virus bzw. dem Hämagglutinin der Atypischen Geflügelpest

Die Versuche zur Abspaltung der Neuraminidase wurden nicht nur am intakten Atypischen Geflügelpestvirus, Stamm Italia, sondern auch am isolierten Hämagglutinin durchgeführt, da es denkbar erschien, dass nach einer schonenden Spaltung des Virus in seine Bestandteile, gebundenes Antigen und Hämagglutinin, durch Äther eine Enzymabspaltung leichter zu bewerkstelligen ist (vergl.Einleitung). Über die Züchtung und Darstellung des Virus und über die Abspaltung sowie den Nachweis des Hämagglutinins, siehe experimenteller Teil. Die spez.Aktivität des Virus lag bei 0,6 Neuraminidase-Einheiten/γ N, die des Hämagglutinins bei E/γ N.

Bei den Versuchen zur Abspaltung des Enzyms aus dem Virus wie aus dem Hämagglutinin wurde vorher und nachher der Hämagglutinationstest durchgeführt. Dieser beruht auf der Fähigkeit des Virus bzw. des freien Hämagglutinins, Erythrocyten zu agglutinieren. Als Hämagglutinationseinheit ist diejenige Virus- bzw. Hämagglutinin-Menge definiert, die unter Standardbedingungen gerade noch zum Verklumpen der Erythrocyten ausreicht.

1.) Nachweis des abgespaltenen Enzyms in Gegenwart von Virus und Virusbestandteilen.

Ehe mit den Versuchen begonnen wurde, die Neuraminidase aus dem Hämagglutinin bzw. aus dem Virus durch verschiedene physikalische, chemische oder enzymatische Methoden frei

zu setzen, wurde eine Methode ausgearbeitet, das freie Enzym neben dem im Virus bzw. Hämagglutinin gebunden nachzuweisen. Beim intakten Virus wurde vorwiegend die Ultrazentrifugation benützt, beim Hämagglutinin die Ultrafiltration.

a) Ultrazentrifugation

Das intakte Virus, das Hämagglutinin und das "gebundene Antigen" sind hochmolekulare Substanzen. Die Sedimentationskonstanten betragen: für das intakte Virus s_{20} = 1 ooo S, für das Hämagglutinin $s_{20} \approx$ loo S, für das gebundene Antigen s_{20} = 20. Wenn die abgespaltene Neuraminidase in ihrer Grösse vergleichbar ist mit dem Neuraminidase Vibrio cholerae ($s_{20} \sim 1$) dann sollte durch Ultracentrifugation ihre Abspaltung von den hochmolekularen Virusbestandteilen möglich sein. Benützt wurde eine Spinco-Ultracentrifuge mit 35 ooo U/min. (siehe experimenteller Teil). Während sich das Virus leicht abzentrifugieren lässt, konnte die im Hämagglutinin enthaltene Neuraminidase-Aktivität in den Blindversuchen oft nur zu 70-80% sedimentiert werden, manchmal allerdings auch zu 100 %.

b) Ultrafiltration

Beim Hämagglutinin wurde ausserdem auch die Ultrafiltration durch Membranfilter zur Abtrennung verwendet. Die Porenweite der Membranfilter wurde so gewählt, dass intaktes Virus und Hämagglutinin vom Filter zurückgehalten wurden, die Neuraminidase aber ohne Aktivitätsverlust das Filter passierte. Auch das vom Filter wieder abgelöste Virus bzw.

Hämagglutinin hatte seine enzymatische Aktivität beibehalten. Sobald jedoch das Hämagglutinin behandelt worden war, ging bei der Ultrafiltration Aktivität verloren, die Summe der Neuraminidase-Aktivität im Niederschlag und im Durchlauf erreichte oft nur 50 % des Ausgangswertes. Die Ausbeute bei der Ultrafiltration konnte durch Zusatz von 1 mg Serumalbumin/ ml verbessert werden. Blindversuche sowohl mit Neuraminidase als auch mit Hämagglutinin und Virus ergaben, dass Albumin die Aktivität nicht beeinflusst.

2.) Abspaltungsversuche

Nachdem es nunmehr möglich war, das abgespaltene Enzym neben dem im Virus oder im Hämagglutinin gebundenen nachzuweisen, wurde mit den Versuchen begonnen, das Virus aus diesen beiden Partikeln abzuspalten und zwar zuerst durch physikalischen Methoden.

a) Physikalische Abspaltungsversuche
(Einfrieren und Wiederauftauen)

Tyrell (1954) versuchte, das Influenzavirus durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen (50 mal, bei -65°C) in kleinere Bestandteile zu zerlegen. Hierbei wurde das Virus vollkommen gespalten, das lösliche Antigen wurde in Freiheit gesetzt, die Infektiosität, sowie die hämagglutinierende und enzymatische Aktivität wurden zerstört.

Es sollte nun versucht werden, unter milderen Bedingungen das Enzym freizusetzen. Von Mohr (Doktorarbeit, 1959) war festgestellt worden, dass die reine Neuraminidase aus Vibrio cholerae 4-5faches Einfrieren durch Eintauchen in Methanol/ CO_2 (-70°) und Wiederauftauen mittels kalten Wasser ohne

Verlust der Aktivität übersteht, die Aktivität stieg sogar etwas an. Analoge Versuche mit Hämagglutinin aus atypischem Geflügelpest-Virus (4oo Enzymeinheiten) in Phosphatpuffer 0,025 m pH 7 oder 9 bewirkten keine Abnahme der Enzymaktivität, setzten aber auch kein Enzym frei.

b) durch Chemikalien

α) Alkali

Schramm und Zillig (1955) gelang es, das TMV durch Behandlung mit mildem Alkali (pH 10, Carbonatpuffer) in Protein und Nucleinsäure zu spalten. Deshalb wurden auch Hämagglutinin und atypisches Geflügelpest Virus alkalisch behandelt, denn in diesem Fall sollte das Enzym abgespalten werden, falls seine Bindung an das Virus elektrostatischer Natur ist oder auf Wasserstoffbrücken beruht. Mit NaOH wurde das Hämagglutinin auf pH 11,2 gebracht, nach 2o min. mit Essigsäure neutralisiert und abzentrifugiert. Im Überstand trat keine Aktivität auf, 80 % der Ausgangsaktivität von etwa 4oo Einheiten fanden sich im Sediment. Das Virus wurde mit NaOH auf pH 11,7 gebracht und analog behandelt. Hier wurde die gesamte Aktivität im Niederschlag aufgefunden. Alkali vermag also keine Neuraminidase abzuspalten.

ß) Harnstoff

Falls das Enzym durch Wasserstoffbrücken an das Hämagglutinin oder an das Virus gebunden ist, sollte eine Abspaltung durch Harnstoff möglich sein. Dass freie Neuraminidase gegen Harnstoff beständig ist, war bereits festgestellt worden. Auch

über die Wirkung von Harnstoff auf Myxoviren lagen schon Befunde vor. Lauffer (1949) hatte festgestellt, dass Influenza-Virus durch 6-stündige Behandlung mit Harnstoff inaktiviert wird. Die Behandlung von Hämagglutinin mit 6, 8 oder 10 m Harnstoff bei verschiedenen Temperaturen und über verschiedene Zeitdauern ergab keine Abspaltung des Enzyms, dagegen wurde die Enzymaktivität und die Hämagglutinationsfähigkeit stark verringert. Bei der Einwirkung von Harnstoff auf das atypische Geflügelpest-Virus wurde die Hämagglutinationsfähigkeit rascher zerstört als die Enzymaktivität. Eine Abspaltung des Enzyms konnte nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Die Spuren an freiem Enzym, die gefunden wurden, lagen innerhalb der Fehlergrenzen. Sowohl bei der Behandlung des Hämagglutinins wie der des Virus mit Harnstoff wurde ein Konzentrat von Virus bzw. Hämagglutinin in die konzentrierte Harnstofflösung gegeben und der Harnstoff vor der Messung der Enzymaktivität durch Dialyse in der Kälte gegen Phosphatpuffer von pH 6,5 - 6,7 0,02m + 0,001 m Cyanid entfernt (Tabelle 6 a und b).

Tabelle 6a

Einwirkung von Harnstoff auf Hemagglutinin

Bedingungen	pH	E/ml in % nach Behandl. Ub	Sd	ges.	HAE in % n.Beh. Ub	Sd	ges.
10m 4°C 1 Std.	7,9	0	24	35	0	14	15
10m 4°C 1 Std.	8,5	0	45	50	0	10	13
10m 20°C 30'	8,5	0	20	28	0	1	3
10m 20°C 1Std.	8,5	0	18	23	0	0	0,1

HAE = hämagglutinierende Einheiten

Das Hämagglutinin wurde teilweise nach der Behandlung durch Ultrafiltration abgetrennt. Die Werte im Niederschlag sind dann unter atypische Geflügelpest angegeben.

Tabelle 6b

Einwirkung von Harnstoff auf das Atypische Geflügelpest-Virus

Bedingungen	pH	E/ml in % nach Behandlung			HAE in % nach Behandlung		
		Üb.	Sd.	gs.	Üb.	Sd.	gs.
6m 20°C 3o min	8,5			92			46
6m 20°C 1 Std	8,5			92			46
6m 4°C 1 Std	8,6			100			46
8m 20°C 3o min	8,5			92			21
8m 20°C 1 Std	8,5			90			21
8m 4°C 1 Std	8,5			100			21
6m 20°C 3o min	8,5	8	65	73	0	35	35
8m 20°C 3o min	8,3			84			25
8m 4°C 3o min	8,5	6	68	93	0	63	63
8m 20°C 3o min	8,5	3	40	80	0	5	5

Die Ausgangswerte lagen bei etwa 130 E/ml und 5000 HAE.

Die Summe von Überstand und Sediment (bzw. Niederschlag) wurde vor der Zentrifugation bestimmt, daher ist sie gelegentlich höher als die beiden Teilwerte.

γ) Thioglycol

Die Wirkung von Thioglycol auf freie Neuraminidase, die zu einer teilweisen Inaktivierung des Enzyms führte, wurde bereits beschrieben. Falls die Neuraminidase über S-S-Brücken an das Hämagglutinin gebunden ist, sollte es möglich sein, durch Thioglycol diese Bindung zu lösen. Wurde Hämagglutinin gleichzeitig mit Harnstoff und Thioglycol behandelt, so wurde die Hämagglutinationsfähigkeit vollkommen zerstört, die Neuraminidase-Aktivität sank stark ab, die Wirkung von Thioglycol allein auf beide Aktivitäten war weniger stark. Eine befriedigende Abspaltung von Neuraminidase konnte nicht erzielt werden, im Höchstfall wurden wenige Prozent erhalten. Die Ergebnisse am atypischen Geflügelpest-Virus waren im wesentlichen die gleichen wie beim Hämagglutinin.

Tabelle 7a

Einwirkung von Thioglycol auf Hämagglutinin, 20°C, 3o min.

Bedingungen	pH	E/ml in % nach Behandlung			HAE in % nach Behandlung		
		Üb.	Sd.	ges.	Üb.	Sd.	ges.
50 mg/ml	8,5	8	20	70	0	0	2,5
50 mg/ml	8,7	2	6,6	12,7	0	0	0
50 mg/ml	8,5	0	12	62	0	10	20
25 mg/ml	8,5	0	4	8	0	0	3
in Gegenwart von 6m Harnstoff							
50 mg/ml	8,5	0	10	30	0	0	0
50 mg/ml	8,5	0	0	0	0	0	0
50 mg/ml	8,5	0	1	2	0	0	0

Tabelle 7b

Einwirkung von Thioglycol auf Atypisches Geflügelpest-Virus
20°C, 3o min, 50 mg/ml

Bedingungen	pH	E/ml in % nach Behandlung			HAE in % nach Behandlung		
		Üb.	Sd.	ges.	Üb.	Sd.	ges.
50 mg/ml in Gegenw. von 8m Harnstoff	8,5	0	0	0	0	0	0
50 mg/ml	8,5	4	28	30	0	0	1,5
Harnstoff Kontrolle	8,6	1,8	72	83	0	.	30

Die Ausgangskonzentration betrug ungefähr 300 E/ml

) Perjodat

Da das Hämagglutinin 12 % Kohlenhydrate enthält, ist eine Bindung des Enzyms an die Zuckermoleküle in Erwägung zu ziehen. Von Fazekas (1949) war bereits die Wirkung von Perjodat auf Myxoviren und zwar auf Influenzastämme untersucht worden. Das Perjodat zerstörte sowohl die Enzymaktivität wie die Infektiosität des Virus, bei längerer Einwirkung auch die Hämagglutinationsfähigkeit.

Tabelle 8

Einwirkung von Natriumperjodat auf Hämagglutinin, 20°C, 3omin.

Bedingungen	pH	E/ml in % nach Behandlung Üb.	Sd.	ges.
ohne Albumin filtriert	6,5	0	10	50
mit 1 mg/ml Albumin filtriert	6,5	0	44	60
mit 1 mg/ml Albumin filtriert	6,5	0	50	60
mit 10 m Harnstoff 1 Std. 4°C	6,5		Spuren	
10 m Harnstoff 4°C 5 min.	6,5	0	23	35

Ausgangskonzentration etwa 400 E/ml

Auf 400 Enzymeinheiten wurden etwa 1 ml 0,1m $NaJO_4$ verwendet.

) Phenol

Durch Phenol-Wasser-Mischung lassen sich Protein-Polysaccharid-Nucleinsäure-Komplexe auftrennen. Das Protein geht dabei in die Phenolphase, Polysaccharid und Nucleinsäure gehen in die Wasserphase (Westphal u.a. 1952). Tabak-Mosaikvirus lässt sich danach in Protein und infektiöse Nucleinsäure trennen (Schuster, Schramm, Zillig 1956). Es ist aber auch denkbar, dass durch Phenol nicht spaltbare Komplexe aus Protein und Polysaccharid nach Homogenisation in Phenol-Wasser in der wässrigen Phase verbleiben, dann nämlich, wenn der Polysaccharidanteil in dem Komplex überwiegt und somit die Löslichkeit bestimmt.
Die Phenolbehandlung wurde deshalb auch beim Hämagglutinin durchgeführt.
Hämagglutinin in verdünntem Phosphatpuffer wurde zweimal mit demselben Volumen 80%igen Phenols in der Kälte geschüttelt und zentrifugiert. Dabei bildete sich zwischen der Phenol- und Wasserphase eine dünne unlösliche Schicht. Beide Phasen und die Zwischenschicht wurden dann getrennt weiter verarbeitet und auf Enzymaktivität geprüft. Aus der Wasserphase wurde das Phenol durch Ausschütteln mit Äther entfernt, der Äther anschliessend durch Einleiten von N_2 ausgetrieben. Die Zwischenschicht löste sich in verdünntem Phosphatpuffer. In der Phenolphase wurden zunächst einige mg Albumin gelöst. Dann wurde durch Zusatz von Äther im grossen Überschuss das Protein gefällt. Das ausfallende Albumin sollte dabei eventuell nur in ganz geringer Menge vorhandenes Hämagglutinin mitreissen. Der Niederschlag löste sich in schwach alkalischer Phosphatlösung. Neuraminidaseaktivität war weder in der wässrigen Phase noch in dem aus der Phenolphase und

der Zwischenschicht gewonnenen Material nachweisbar.

c) durch Enzyme

Bei Verwendung von Enzymen zur Abspaltung vonNeuraminidase aus Virus besteht gegenüber den meisten verwendeten chemischen Agentien der Vorteil, dass man unter sehr milden Bedingungen arbeiten kann. Da das Hämagglutinin ein Komplex aus Protein und Kohlenhydraten ist, wurden solche Enzyme verwandt, die Peptidbindungen lösen (Trypsin, Chymotrypsin, Hydrolasengemisch aus A.oryzae). Ausserdem wurde Lysozym verwandt, welches die aus Proteinen und Kohlenhydraten bestehende Zellwand von Bakterien aufzulösen vermag.

α) Lysozym und Hydrolasen

Wurde Hämagglutinin 4o min. mit Lysozym oder eine Stunde mit Hydrolasen aus A.oryzae bei 37°C behandelt, so fiel die Aktivität kaum stärker ab als in der Kontrolle. Eine Abspaltung von Neuraminidase war nicht festzustellen. Das Virus wurde mit beiden Enzymen länger inkubiert, jedoch wurde ebenfalls keine Neuraminidase abgespalten.

ß) Trypsin

Es war bereits festgestellt worden, dass freie Neuraminidase aus Vibrio cholerae in unreiner Form gegen Trypsin relativ beständig ist, während reine Präparate sehr schnell inaktiviert werden.

Bei der Einwirkung von Trypsin auf Hämagglutinin oder auf atypisches Geflügelpest-Virus wurden Konzentration von 100 γ/ml Trypsin auf 400-600 Neuraminidase-Einheiten benützt, was auf N bezogen dem sehr hohen Verhältnis von 30 : 100 entspricht. Man liess das Trypsin bei 37°C solange wirken, bis die Hämagglutinationsfähigkeit vollkommen zerstört war, was beim Hämagglutinin nach 3-5 Stunden und beim Virus nach 24-36 Stunden der Fall war. Ältere Viruspräparate benötigen eine kürzere Behandlungszeit als frische. Nach Beendigung der Enzymbehandlung wurde die Neuraminidaseaktivität gemessen und dann das Hämagglutinin wie das Virus abzentrifugiert und im Niederschlag wie im Überstand nochmals die Neuraminidase-Aktivität und die Hämagglutinationsfähigkeit bestimmt.

Beim Hämagglutinin fand man nach der Trypsinbehandlung noch etwa 30% der ursprünglichen Neuraminidase-Aktivität und zwar etwa die Hälfte davon (15%) gebunden im Niederschlag und die Hälfte (15%) frei im Überstand. Wurde zur Kontrolle Hämagglutinin ohne Zusatz von Trypsin 3-5 Stunden bei 37°C aufbewahrt, so sank die Neuraminidase-Aktivität ebenfalls auf 30-40 % ab. Nach dem Zentrifugieren wurde nur noch im Niederschlag eine geringe Hämagglutinationsfähigkeit beobachtet. Damit kann es trotz der grossen Instabilität des Kontrollhämagglutinins als sicher angesehen werden, dass Trypsin vom Hämagglutinin Neuraminidase-Aktivität abspaltet.

mit dem Virus wurde eine grössere Anzahl von Versuchen durchgeführt als mit dem Hämagglutinin. In den Kontrollen blieb beim Aufbewahren das Virus bei 37°C ohne Zusatz von Trypsin die Neuraminidase-Aktivität über 24 Stunden erhalten, erst nach noch längerer Zeit sank sie ab. Nach der Trypsinbehandlung wurden 40-65 % der Neuraminidase-Aktivität wiedergefunden, davon etwa 20-35 % frei im Überstand. Bei der langen Inkubation des Virus spaltet also Trypsin sowohl Neuraminidase ab und zerstörte sie auch teilweise. Wurden beim Virus höhere Enzymkonzentration, bis zu 400 - 500 γ/ml Trypsin benützt, so war die Ausbeute an freier Neuraminidase nicht höher und auch die Einwirkungsdauer konnte nicht verringert werden. Auch eine Vorbehandlung mit Harnstoff verbesserte die Ergebnisse mit Trypsin nicht.

Während dieser Untersuchungen wurden Ergebnisse von Mayron, Rafelson (1960) veröffentlicht, denen es gelang, bei zwei Influenzastämmen mit Trypsin nach 16 Stunden bei 37°C 70-90 % der Neuraminidase abzuspalten. Diese guten Ergebnisse konnten beim Atypischen Geflügelpestvirus nicht reproduziert werden.

d) durch oberflächenaktive Stoffe

Von Hoska (1959) war festgestellt worden, dass die Aufspaltung von Influenza in Untereinheiten durch Zusatz von oberflächenaktiven Stoffen zum Äther erleichtert wird.

Ausserdem wird die Ausbeute an Hämagglutinin erhöht. Von Rott (1961) wurden ähnliche Ergebnisse mit Tween 80 am Atypischen Geflügelpestvirus erhalten. Tween ist ein Polyoxyäthylenderivat eines Sorbitanhydrids, das teilweise mit Fettsäure verestert ist. 80 gibt die ungefähre Zahl der insgesamt vorhandenen Oxyäthylengruppen an. Es wurde geprüft, ob Tween auch die Neuraminidase aus dem Virus abspalten kann. Zu diesem Zweck wurden 2 ml einer Viruslösung, die etwa 8000 HA Einheiten enthielt, mit 1o mg Tween bei 37°C versetzt und 24 Stunden gerührt. Danach war die Hämagglutinationsfähigkeit zerstört. Dann wurde zentrifugiert. Im Überstand wurde 1oo % der ursprünglich an das Virus gebundenen Neuraminidase gefunden und im Sediment nochmals dieselbe Menge. Um auszuschliessen, dass die Neuraminidase-Aktivität im Überstand bei der Behandlung mit Tween etwa auf einer unvollkommenen Sedimentation des Virus beruht, wurde eine Viruslösung mit Tween versetzt und sofort zentrifugiert. In diesem Falle fand sich die gesamte Neuraminidase-Aktivität im Sediment und keine im Überstand. Der Anstieg der gesamten Enzymaktivität auf das Doppelte durch die Tween-Behandlung beruht wohl darauf, dass niemals die ganze Neuraminidase-Aktivität erfasst wird, wenn der Enzymtest am intakten Virus durchgeführt wird. Der Versuch wurde mit einem frischen Viruspräparat wiederholt und führte zu demselben Ergebnis. Nur dauerte es hier 4o Stunden, bis die Hämagglutinationsfähigkeit zerstört war und zentrifugiert werden konnte. Im Kontrollversuch, bei dem das Virus allein 24 Stunden bei 37°C gerührt wurde, war keine Abspaltung von Neuraminidase und auch keine Abnahme der Enzymaktivität im Virus zu beobachten.

In diesem Abschnitt wurde also gezeigt, dass die Neuraminidase-Aktivität vom Virus bzw. vom Hämagglutinin abgespalten werden kann. Die Abspaltung gelingt am besten mit Tween, 100 %, weniger befriedigend mit Trypsin, 2o-3o %. Mit Harnstoff und mit Thioglykol konnte nur eine geringfügige Abspaltung erzielt werden, die innerhalb der Fehlergrenzen liegt. Die abgespaltene Enzymaktivität fand sich im Überstand, wenn die Virus- bzw. Hämagglutininpartikel in der Ultrazentrifuge quantitativ sedimentiert wurden. Dies bedeutet, dass die Enzymaktivität tragenden Bruchstücke des Virus wesentlich kleiner sein müssen als das Virus bzw. das Hämagglutinin.

IV. Versuche zur Anreicherung der abgespaltenen Neuraminidase

Nachdem die Abspaltung des Enzyms aus dem Virus bzw. dem Hämagglutinin mit Trypsin und vor allem mit Tween befriedigend gelang, sollte versucht werden, das Verfahren zu einer Anreicherung des Enzyms zu benützen und auf diese Weise Präparate möglichst hoher spezifischer Aktivität herzustellen. Das Verfahren der Abspaltung sollte mit einer Säulenchromatographie kombiniert werden und geprüft werden, wieweit eine Trennung von Virus, Hämagglutinin und Enzym möglich ist. Um die Säulen zu testen, wurden zunächst Versuche mit dem Virus bzw. dem Hämagglutinin durchgeführt. Es gelang zwar, diese zu adsorbieren, doch konnten sie nicht befriedigend eluiert werden. Die Säulenchromatographie erwies sich daher als ungeeignet zur Reinigung von Atypischem Geflügelpestvirus oder Hämagglutinin, dagegen, wie später

gezeigt wurde, in Kombination mit der Abspaltung durch Trypsin oder Tween als sehr brauchbar für die Anreicherung des Enzyms.

1.) Säulenchromatographie des Atypischen Geflügelpest-Virus u. des Virus-Hämagglutinins

Da das Atypische Geflügelpest-Virus und das Hämagglutinin beide Neuraminidase enthalten, war zu erwarten, dass auch beide an einer Kieselgurstromatasäure adsorbiert würden, wie es Schramm und Mohr mit der Neuraminidase aus Vibrio cholerae gelungen war. Die Adsorption erfolgte auch tatsächlich aus einem alkalischen Puffer bei $0^{o}C$. Dagegen musste zur Elution die Temperatur auf $37^{o}C$ erhöht werden und das pH des Puffers von 5,5 auf 6,4. Das sind die gleichen Bedingungen, unter denen auch das Virus von den agglutinierten Erythrocyten allein eluiert wird.
Bei der Elution von Atypischem Geflügelpest-Virus wurden 100 oder sogar 150 % der Neuraminidase-Aktivität, aber nur 25 % der Hämagglutinationsfähigkeit und ebenso viel der Infektiosität wieder gewonnen. Die spezifische Neuraminidase-Aktivität war auf das 10-fache gestiegen. Die Neuraminidase-Aktivität war an die Viruspartikel gebunden, denn sie sedimentierte mit diesen und das Sediment zeigte im Elektronenmikroskop die charakteristische Form der Viren. Die Erhöhung der Enzymaktivität kann entweder darauf beruhen, dass Inhibitoren entfernt werden, oder dass assoziierte Virusteilchen dissoziieren. Bei Hämagglutinin wurden

im wesentlichen dieselben Ergebnisse erhalten, die gesamte Enzymaktivität, aber nur 1/4 der Hämagglutinations-Aktivität konnten eluiert werden. Worauf der Verlust an Hämagglutinationsfähigkeit beruht, konnte nicht geklärt werden.

Anstelle von Kieselgur als Träger wurden auch andere Stromatasäulen mit Al_2O_3, Bimsstein und Kieselgel verwendet, doch liess sich stets das Virus zwar adsorbieren, aber nur teilweise oder gar nicht eluieren. Eine Reinigung des Virus oder des Hämagglutinins nach dem Säulenverfahren war also nicht möglich. Für eine Anreicherung des Enzyms scheint das Säulenverfahren dagegen vielversprechend, da die Neuraminidase-Aktivität des Atypischen Geflügelpest-Virus nach Passieren der Säule erhöht war. Im nächsten Kapitel werden entsprechende Versuche behandelt.

2.) Säulenchromatographie von Virusneuraminidase nach Trypsinspaltung

Zur Säulenchromatographie wurde eine Viruslösung benützt, auf die 24 Stunden Trypsin eingewirkt hatte. Bei einer Stichprobe waren nach der Zentrifugation im Überstand meist 22 % und im Niederschlag 25 % der ursprünglichen Neuraminidase-Aktivität gefunden. In einem Kontrollversuch wurde zunächst gezeigt, dass Trypsin allein sich von einer mit Erythrocyten hergestellten Säule mit dem sog. Adsorptionspuffer, Borat von pH 9, bei 0° vollkommen eluieren lässt. Mittels Ninhydrin wurde nach dem Verfahren von Stein und Moore das eingesetzte Trypsin quantitativ im Durchlauf gefunden.

Die Virus-Trypsin-Lösung wurde nun mit NaOH auf pH 9 gebracht, und wie für das reine Virus beschrieben, auf die mit Erythrocyten beladene Säule gegeben. Zur Entfernung des Trypsins wurde mit Adsorptionspuffer gewaschen, bis der Durchlauf im Zeiss-Absorptionssepktrometer keine für Protein charakteristische Extinktion bei 280 mu mehr zeigte. Dann wurde zunächst die freie Neuraminidase bei pH 5,5 mit Acetatpuffer bei 0°C eluiert. Es wurden ungefähr 10-15 % der ursprünglich im Virus enthaltenen Neuraminidase gewonnen. Die spezifische Aktivität betrug 73 E/γ N, dies entspricht einer Anreicherung um den Faktor 100. Zum Vergleich sei angeführt, dass Schramm und Mohr bei der Reinigung der Neuraminidase aus Vibrio cholerae einen Anreicherungsfaktor von 6 000 mit der Säulenchromatographie und eine spezifische Aktivität von 120-130 γ E/γ N erzielten. Mayron et al.(1961) erhalten eine Reinigung um den Faktor 20 bei Abspaltung mit Trypsin Filtration und Entfernung der Lipide mit Äther.

a) mit Tween abgespalten

Abschliessend wurde die Abspaltung der Neuraminidase durch Tween mit der Säulenchromatographie kombiniert. Zunächst wurde festgestellt, dass das Virus in Gegenwart von Tween an der mit Erythrocytenstroma beladenen Säule nur haftet, wenn man die Lösung zweimal und ganz langsam, d.h. also unter geringem Stickstoff-Druck durchlaufen lässt. Das Tween konnte im Durchlauf durch eine Schaumbildung nachgewiesen werden. Begleitproteine wurden ebenfalls im Durchlauf durch ihre Absorption festgestellt. Ein frisches Viruspräparat, welches

4o Stunden lang unter Rühren bei 37°C mit Tween (5 mg/ml) behandelt worden war, wurde auf eine Säule gegeben und der Durchlauf ein zweites Mal an der Säule adsorbiert. Wie bei der Säulenchromatographie nach Trypsinbehandlung wurde dann zuerst die Neuraminidase und schliesslich das Virus eluiert; die Ausbeute an Neuraminidase betrug 5o %, die spezifische Aktivität war 45, die Neuraminidase war also beträchtlich gereinigt worden. Die spezifische Aktivität, erhalten von Mayron (1961) betrug von 0,9 - 2o. Die spezifische Aktivität der Virusneuraminidase betrug etwa 1/3 der Aktivität der Neuraminidase aus Vibrio cholerae nach der Säulenchromatographie. Die Säulenchromatographie des Enzyms nach der Abspaltung durch Trypsin oder Tween bietet gegenüber der Zentrifugation den Vorteil, dass auch eine Reinigung von dem Abspaltungsmittel und von kleinen Begleitproteinen erreicht wird und dass auf diese Weise das Enzym angereichert wird. Es werden relativ hohe Werte der spezifischen Aktivität erzielt. Ob die Methode auf andere Stämme des Virus der Atypischen Geflügelpest anwendbar ist, wurde nicht geprüft.

V. Vorläufige Versuche zur Charakterisierung der Neuraminidase aus Atypischem Geflügelpest-Virus

Nach dem Verhalten bei der Abspaltung scheint die Virus-Neuraminidase der Neuraminidase aus Cholera-Vibrionen sehr ähnlich zu sein. Durch das Anreicherungsverfahren, das auf Abspaltung des Enzyms mittels Trypsin oder Tween und Säulenchromatographie beruht, war die Möglichkeit geschaffen,

Enzympräparate relativ hoher spezifischer Aktivität zu gewinnen und an diesen die Eigenschaften des Virusenzyms zu prüfen. Da jedoch dieses gereinigte Material sehr kostspielig ist, wurden einige Vorversuche an der im Virus gebundenen Neuraminidase durchgeführt.

1.) pH-Abhängigkeit

Die Neuraminidase aus Cholera-Vibrionen zeigt ein Aktivitätsmaximum bei einem pH von 6 - 6,5, das Aktivitätsmaximum des Virusenzyms liegt im selben Bereich; doch fällt hier die Aktivität im alkalischen Gebiet langsamer ab.

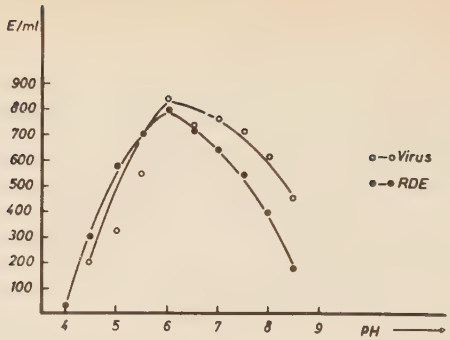
2.) Temperatur-Abhängigkeit

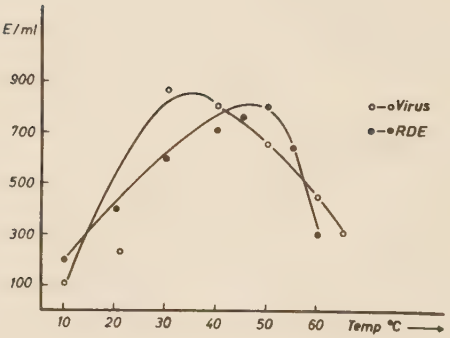
Bei der Cholera-Neuraminidase steigt die Aktivität mit der Temperatur langsam an und erreicht ein Maximum bei 50°C, nachher fällt sie sehr steil ab. Das Aktivitätsmaximum der Virus-Neuraminidase liegt bei derselben Temperatur, doch ist der Abfall nach der Seite der hohen Temperaturen viel weniger steil.

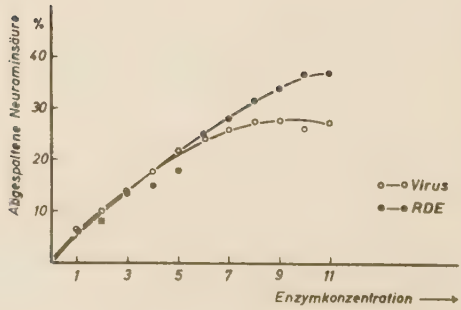
3.) Konzentrationsabhängigkeit

Bei der Neuraminidase aus Cholera-Vibrionen steigt die Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration steiler an, als bei der Virus-Neuraminidase, der lineare Bereich ist bei der letzteren kürzer als bei der ersten.

Diese Ergebnisse über die pH-Abhängigkeit und Temperatur-Abhängigkeit sind im Einklang mit den von Mayron (1961) mitgeteilten Resultaten, die mit Neuraminidase aus den Virusstämmen Asian und PR 8 erhalten wurden.


E/ml
900
800
700
600
500
400
300
200
100
4
5
6
7
8
9
pH
o—o Virus
•—• RDE


E/ml
900
700
500
300
100
10
20
30
40
50
60
Temp °C
o—o Virus
•—• RDE


Abgespaltene Neuraminsäure %
40
30
20
10
1
3
5
7
9
11
Enzymkonzentration
o—o Virus
•—• RDE

VI. Methoden

1.) Präparation von Neuraminidase aus Vibrio cholerae

Die Rohfiltrate aus den Kulturen von Cholera-Vibrionen (Behringwerke Marburg) werden auf einen Natriumchloridgehalt von 0,9 % und mittels 1n NaOH auf pH 8-9 gebracht. Die Lösung wird auf 0°C abgekühlt. In einem Liter sind etwa 50 000 Enzymeinheiten enthalten. Hierzu werden 3mal gewaschene, gekühlte und sedimentierte Erythrocyten gegeben und mit einem Magnetrührer 15 min. gerührt. Die Erythrocyten werden dann in der Kühlzentrifuge bei 3500 U/min abgeschleudert und im Doppelten ihres Volumens (75 ml) an Acetatpuffer von pH 5,5 aufgenommen und 90 min. bei 37°C unter mehrmaligem Umschwenken eluiert.

Das Verfahren wird mit dem gekühlten Überstand der ersten Adsorption wiederholt. Nach der Elution des Enzyms wird abzentrifugiert. Die Neuraminidase befindet sich im Überstand. Die Lösung wird gegen Boratpuffer von pH 9 dialysiert und durch Einfrieren auf -15°C stabil gehalten.

2.) Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität

Die Neuraminidase-Aktivität wurde in gleicher Weise wie von Schramm und Mohr bestimmt. Man liess Enzymlösung in 0,1 m Maleinatpuffer unter Zusatz von 0,02 m Calciumchlorid, insgesamt 1 ccm, mit 1 ccm Stromatalösung, die 200 γ Neuraminsäure/ml enthielten, 15 min. bei 37°C inkubieren. Nachher wurden die Stromata mit einer 10%igen Lösung von Benzoesäure in Chloroform ausgefällt und 5 min. bei 3000 U/min.

abzentrifugiert. In 1 ml des Überstands wurde die Neuraminsäure nach der Bialschen Orcinmethode bestimmt. Hierzu wurde das Orcin (Merck) auf 120°C erhitzt, um das Kristallwasser zu entfernen, dann wurde es in Chloroform gelöst, filtriert und umkristallisiert. Waren die Präparate stärker zersetzt, wurden sie durch Zusatz von Aktivkohle gereinigt. Zur Kontrolle wurde der Schmelzpunkt von 106-108°C gemessen. Das Reagenz konnte 4-5 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die Eichkurve wurde mit kristallisierter Methoxyneuraminsäure aufgenommen. Diese wurde bei 60°C 12 Stdn. über P_2O_5 getrocknet und dann 100 γ je ml H_2O gelöst. Es wurde eine Konzentrationsreihe von 5-80 γ Neuraminsäure hergestellt, mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt und dann die Orcinbestimmung durchgeführt.

Zum Ausschütteln des Farbstoffs wurde stets derselbe Amylalkohol benützt. Die Extinktionen werden im Eppendorf-Photometer mit dem Filter 578 mu gegen reinen Amylalkohol gemessen.

3.) Darstellung der Stromata

Die Rindererythrocyten-Stromata wurden in gleicher Weise wie die von Mohr benützten Hammelerythrocyten hergestellt. Rinderblut wurde durch Schütteln mit Glasperlen defibriniert, durch Zentrifugieren wurden die Erythrocyten abgetrennt, dann mehrmals mit physiologischer NaCl-Lösung (0,9%) gewaschen und in destilliertem Wasser hämolysiert. Die Stroma-

ta wurden dann bei 15 000 U/min. 35 min. lang abzentrifugiert, in physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen und nach etwa 10 min. Quelldauer erneut abzentrifugiert. Hämolyse und Quellen wurden mehrmals wiederholt. Zum Schluss wurde der Niederschlag in Boratpuffer oder in Wasser aufgenommen, mit einem Tropfen Alkohol versetzt und eingefroren. Ein Versuch, die Stromata durch Fällung mit Benzoesäure zu konzentrieren, um so die Zahl der notwendigen Zentrifugationen zu verringern, brachte keinen Erfolg.

4.) Behandlung von Neuraminidase, Hämagglutinin und Atypisches Geflügelpest-Virus mit Thioglycol

Thioglycol wurde vor der Verwendung unter Vakuum (10-12 mm Hg) destilliert und die bei 105-107°C übergehende Fraktion genommen. Die Flasche wurde unter Stickstoff verschlossen und aufbewahrt. Thioglycol wurde zu dem benützten Phosphatpuffer von pH 7,5 zugegeben und mit 1 m NaOH das pH auf 8,3 - 8,6 gebracht. Zur pH-Messung diente ein pH-Meter.

Falls die Einwirkung von Thioglycol in Gegenwart von Harnstoff geprüft werden sollte, wurde die nötige Menge Harnstoff zur Thioglycol-Lösung zugegeben und das pH geprüft. Bevor die Enzymaktivität bestimmt wurde, wurden Thioglycol und Harnstoff durch Dialyse gegen Phosphatpuffer 0,025 m + 0,001 KCN pH 6,5 in der Kälte entfernt.

Tabelle 9

Einwirkung von Enzymen auf Hämagglutinin

Bedingungen	pH	E/ml in Üb.	% n.Behandlg. Sd.	ges.	HAE in Üb.	% n.Behand. Sd.	ges.
Lysozym							
50 γ/ml 10'	6,0	0	70	72			
Kontrolle	6,0	0	90	90			
50 γ/ml 20'	6,0	0	56	58			
Kontrolle	6,0	0	68	70			
50 γ/ml 40'	6,0	0	35	50			
Kontrolle	6,0	0	50	58			
50 γ/ml 4o'	6,0	0	4o	62			
Kontrolle	6,0	0	60	62			
nach 8m Harnstoff 10' 4°C 50 γ/ml 40'	6,0	0	55	72	0	80	100
Hydrolasen							
100 γ/ml 1 Std.	7,0	0	50	52			
nach 8m Harnstoff 10' 4°C 100 γ/ml 1 Std.	7,0	0	50	55			
Trypsin							
50 γ/ml 1 Std.	7,5	0	40	77	0	30	40
60 γ/ml 6 Std.	7,0	4	5	28	0	0	0
Kontrolle 6Std.	7,0	0	30	33	0	75	80
75 γ/ml	7,5	16	15	27	0	0	0
Kontrolle	7,5	0	23	36	0	100	100
50 γ/ml 12Std.	7,5	0	15	18	0	0	0
Kontrolle	7,5	0	25	30	0	40	50

Ausgangsmenge etwa 400 E/ml

Tabelle 9a

Einwirkung von Enyzmen auf Atypisches Geflügelpest-Virus

Bedingungen	pH	E/ml in% n.Behandl.			HAE in% n.Behandl.		
		Üb.	Sd.	ges.	Üb.	Sd.	ges.
Lysozym							
100 γ/ml 15 Std. 37°C	6,0			80			100
Chymotrypsin							
100 γ/ml 16 Std. 37°C	7,5	0	17	18	0	0	0
Hydrolasen							
100 γ/ml 1 Std. 37°C	7,5	0	8	9	0	0	0
Kontrolle	7,5	0	100	100	0	100	100
Trypsin							
70 γ/ml 34 Std.	7,5	32	35	65	0	0	0
Kontrolle	7,5	0	70	75	0	100	100
75 γ/ml 24 Std.	7,5	36	34	67	0	0	0
Kontrolle	7,5	0	70	100	0	100	100
200 γ/ml 23 Std.	7,5	35	27	65	0	0	0
Kontrolle	7,5	0	60	63	0	10	10
200 γ/ml 23 Std.	7,5	5	11	14	0	0	0
Kontrolle	7,5	0	92	97	0	40	40
270 γ/ml 36 Std.	7,5	20	25	65	0	0	0
2,04 mg/ml23Std.	7,5	10	20	30	0	0	0
4,425mg/ml16Std.	7,5	10	14	20	0	0	0
Kontrolle	7,5	0	50	60	0	70	80

Ausgangsmenge etwa 300-400 E/ml

Tabelle 9b

Einwirkung von Trypsin auf Atypisches Geflügelpest-Virus nach Vorbehandlung mit Harnstoff 100 γ/ml

Bedingungen	pH	E/ml in% n.Behandl.			HAE in% n.Behandl.		
		Üb.	Sd.	ges.	Üb.	Sd.	ges.
H. 9M.30min. 20°C 22 St.Try	7,5	28	64	0	0	0	0
Kontrolle	7,5	0	98	100	0	35	40
H. 6M.1Std. 4°C 22 St.Try	7,5	13	35	56	0	0	0
Kontrolle	7,5	0	85	92	0	100	100
H. 8M. 1Std. 4°C 22 St.Try.	7,5	10	35	50	0	0	0
Kontrolle	7,5	0	65	70	0	70	80
H. 8M. 1St. 20°C 17 St.Try	7,5	24	26	35	0	0	0
Kontrolle	7,5	0	45	50	0	60	6

5.) Darstellung von Atypischem Geflügelpest-Virus

Die Versuche wurden mit dem Atypischen Geflügelpest-Virus Stamm Italia durchgeführt (Schäfer, Schramm, Trau 1949). Für die Passagen wurden 11 Tage lang bebrütete, befruchtete Hühnereier benützt, die durch Injektion von etwa 10^1-10^2ID 50 (Injektionsdosis, die bei der Hälfte der Individuen zum Absterben führt), vom stumpfen Pol aus blind ins Eiinnere infiziert wurden. Ein Ei liefert etwa 5 ml Flüssigkeit, die 2^{+7} bis 2^{+8} Hämagglutinationseinheiten enthalten.

Die Reinigung und Konzentrierung des Virus aus der Allantoisflüssigkeit erfolgte durch 2 Cyclen von abwechselnd hoch- und niedertourigem Zentrifugieren mit der Spinco-Ultracentrifuge (15 ooo U/min) und der Stock-Zentrifuge (3 ooo U/min). Das Material für diese Reinigung wurde steril gehalten.

6.) Darstellung des Hämagglutinins

Gereinigte Viruskonzentrate wurden mit der gleichen Menge perioxydfreien Äther 3o min. lang bei 4^oC in einer Schüttelmaschine geschüttelt (2oo - 3oo Hübe/min). Die wässrige und die organische Phase wurden darauf durch lo min langes Zentrifugieren bei 3 ooo U/min getrennt. Aus der Wasserphase wurde der Äther durch Durchströmen von N_2 entfernt. Die höchste Ausbeute erhielt man bei der Schütteldauer von 3o min. bei noch längerem Schütteln sank sie wieder ab. Sie betrug etwa 5o %.

7.) Bestimmung der Hämagglutinationsaktivität

Die Hämagglutinations-Reaktion (HA) führten wir in der üblichen Weise in Plexiglasplatten durch, die 80 Vertiefungen enthielten. Ein Viruskonzentrat wurde mit 0,9%iger wässriger NaCl-Lösung so verdünnt, dass fallende Potenzen von 2 erhalten wurden (1, 1/2, 1/4, 1/8). Gefüllt wurden jeweils 10-20 Vertiefungen mit je 0,4 ccm. Dazu wurden 0,4 ccm einer 1 %igen Hühnererythrocytenlösung in 0,9% NaCl gegeben. Nach 45 Minuten in der Kälte wurde abgelesen. Die hämagglutinierten Erythrocyten hatten sich dann an der gesamten Wand des Loches abgesetzt, die nicht hämagglutinierten nur am Boden. Es konnte auf diese Weise festgestellt werden, bei welcher Verdünnung noch eine Hämagglutination eintritt. Der Kehrwert dieser Grenzverdünnung gibt die Zahl der in der Ausgangslösung vorhandenen hämagglutinierenden Einheiten an (z.B. Grenzverdünnung 2^{-15}, Ausgangslösung 2^{15} = 15684).

8.) Bestimmung der Virusinfektiosität

Die Infektiosität wurde mit Hilfe des plaque-Tests bestimmt. Verwendet wurden 24 Stunden alte Kulturen embryonaler Hühnerzellen, die mit 0,2 ml Viruslösung von verschiedenem Verdünnungsgrad infiziert wurden. Zur Überschichtung verwendeten wir ein Agar-Medium, das folgende Zusammensetzung hatte: Laktose-Hefeextrakt + L, 1% Agar + 2,7 % Kälberserum + 0,14 % Magermilchpulver (Molico der Firma Nestle, AG. Lindau) + 25 Einheiten "Moronal" (Antibiotikum Squibb) pro ccm. Der Test wurde 3 Tage nach der Infektion abgelesen. Als plaque

bildende Einheit (PBE) wird diejenige Virusmenge bezeichnet, die einen Plaque erzeugt. Eine PBE entspricht bei Atypischem Geflügelpest-Virus einigen wenigen Virusteilchen.

9.) Ultrafiltration und Ultrazentrifugation

Zur Ultrafiltration wurde die Apparatur nach Zsigmondy (Membranfilter-Gesellschaft) benützt. Die Eisenunterlage der Filter und die Papierfilter wurden durch Glasfaserpapier ersetzt, um eine Adsorption der Neuraminidase zu vermeiden. An die Membranfilter wurde ein Stickstoff-Druck bis zu einer Atmosphäre angelegt. Es musste mit einem Verlust von 0,5 ml gerechnet werden. Die verwendeten Filter waren die Grösse "Mittel" der Ultrafeinfilter, der Porendurchmesser lag bei 20 - 35 mu.

Zur Ultrazentrifugation wurde die Spinco-Ultrazentrifuge mit dem Schwenkrotor 39 benützt, die Zahl der Umdrehungen war 35 ooo U/min, entsprechend g = 132 5oo.
Meist wurden zur Ultrazentrifugation 2 ml verwendet. 1 bis 1,3 ml des Überstands wurden mit einer Spritze abgesaugt, wobei eine Berührung des Sediments sorgfältig vermieden wurde. Der restliche Überstand von 0,7 ml wurde abgekippt und dann das Sediment wieder in der ursprünglichen Menge Flüssigkeit aufgenommen.

10.) Säulenchromatographie

Zur Reinigung des Atypischen Geflügelpest-Virus wie des Hämagglutinins sowie zur Abspaltung der Neuraminidase aus dem Virus bzw. dem Hämagglutinin mit Trypsin oder mit dem Netzmittel Tween wurde stets dieselbe Art von Säule verwandt.

Als Adsorptionspuffer wurde 0,01 m Borat mit 0,1 % $CaCl_2$ und 0,9 % NaCl vom pH 9 benützt, als Elutionspuffer 0,1 m Maleinat mit 0,02 m $CaCl_2$ vom pH 6,4. Zur Herstellung der Säule wurden 2 g geschlämmtes Kieselgur zunächst mit 15-20ml Adsorptionspuffer und dann mit Elutionspuffer gewaschen und jeweils abzentrifugiert. Nun wurden 5 ccm Adsorptionspuffer zum Kieselgur hinzugefügt und hierzu 2-3 mal einer konzentrierten Lösung von Erythrocytenstroma, die 3oo bis 4oo γ Neuraminsäure enthielt. Die Adsorption erfolgte innerhalb weniger Minuten. Nachher wurde abzentrifugiert und mehrfach mit Adsorptions- wie Elutionspuffer gewaschen und schliesslich das mit Stromata beladene Kieselgur in 4 ml Adsorptionspuffer aufbewahrt. Um festzustellen, wieviel Erythroeyten am Kieselgur adsorbiert sind, wurde die anhaftende Neuraminsäure nach der Bialmethode bestimmt. Pro ml wurden loo - 15o γ Neuraminsäure gefunden. Das mit Erythrocytenstroma beladene Kieselgur wurde dann im Adsorptionspuffer in eine Glassäule von lo mm Durchmesser und 36 cm Länge eingefüllt und mit Adsorptionspuffer gewaschen. Die Säule wurde nun auf 0°C abgekühlt und mit der Virus- bzw. Hämagglutininlösung versetzt. Hierzu wurden Mengen verwendet, die etwa 7oo Enzymeinheiten enthielten und in 5 ml Adsorptionspuffer oder 0,025 m Phosphatpuffer gelöst waren, der mit Natronlauge auf pH 9 gebracht wurde. Zum Nachwaschen wurde Absorptionspuffer benützt. Die Elution wurde im Gegensatz zu Mohr bei 37°C und mit einem Puffer von pH 6,4 durchgeführt. Das pH konnte im Elutionspuffer noch weiter erhöht werden, in dem statt Maleinat Trismaleinat benützt wurde.

11.) Stickstoffbestimmung

Zuerst wurde das Ammoniak im Vakuum-Exsiccator über P_2O_5 und konz. H_2SO_4 entfernt, dann wurde die Lösung mit 0,1 m NaOH leicht alkalisch gemacht und dieser Prozess 3-4 mal wiederholt. Danach wurde die Probe in schwachem Alkali gelöst und die gleiche Menge 12 n HCl zugegeben, um etwa 6 n HCl einzustellen. 17 Stunden lang wurde im Einschlussrohr bei 110°C hydrolysiert. Nach dem völligen Abdampfen der Salzsäure im Vakuum bei 5o-6o°C wurde der Rückstand in 2 ml 2m Citratpuffer vom pH 5,5 aufgenommen. Hierzu wurde etwa dieselbe Menge Ninhydrinlösung gegeben, die nach Stein und Moore hergestellt war. Die Eichkurve wurde für Mengen zwischen 0,1 - 1 Mikromol mit Alanin aufgenommen. Für die N-Bestimmung in der Neuraminsäure wurden 4oo - 6oo Einheiten eingesetzt.

Verwendete Chemikalien

Die Enzyme Trypsin, Lysozym und Chymotrypsin wurden von Nutritional Biochemical Corporation bzw. Carl Roth Karlsruhe bezogen. Das Hydrolasengemisch aus Aspergillus oryzae stammte von Boehringer & Söhne, Mannheim.

Zusammenfassung

Zunächst wurde die Stabilität der Neuraminidase aus Vibrio cholerae gegenüber Harnstoff, Thioglycol, Natriumperjodat und proteolytischen Enzymen wie Trypsin, Chymotrypsin und Papain, sowie gegenüber Hydrolasen und Lysocym untersucht. Ausserdem wurde die pH Stabilität geprüft und die Konzentration an zweiwertigen Ionen bestimmt, die für die Aktivität erforderlich sind (Ca^{++}, Mg^{++} und Mn^{++}).

Auf Grund dieser Vorversuche wurde versucht, die Neuraminidase aus dem Virus der Atypischen Geflügelpest, Stamm Italia, und aus dessen Hämagglutinin abzuspalten. Harnstoff, Thioglycol und Perjodat ergaben negative Resultate.

Eine befriedigende Abspaltung wurde mit Trypsin (Ausbeute 20-35 %) und dem oberflächenaktiven Stoff Tween (Ausbeute 80-100 %).

Eine 100-fache Anreicherung der Virusneuraminidase wurde durch Chromatographie an mit Erythrocytenstromata beladenen Kieselgursäulen nach dem Verfahren von Schramm und Mohr erzielt. Die spezifischen Aktivitäten betrugen 50-70 E/γ N, waren also etwa genau so gross wie bei der Neuraminidase aus Cholera-Vibrionen nach der Säulenchromatographie.

Ferner wurde ein vorläufiger Vergleich der Eigenschaften der beiden Neuraminidasen durchgeführt.

Literaturverzeichnis

1.) Ada,G.L., E.L.French; Nature (London) 183, 1740 (1959)

2.) Ada,G.L., E.L.French; Austrl.J.Science 13, 82 (1950)

3.) Böhm,P., St.Dauber, L.Baumeister; Klin.Wschr.32, 289 (1954)

4.) Burnet,F.M., W.M.Stanley, Academic Press,New York, The Viruses, 1959

5.) Davenport,F.M., R.Rott, W.Schäfer; J.Expt.Med. 112, 765 (1960)

6.) Faillard,H., Hoppe Seyler Z. 307, 62 (1957)

7.) Fazekas de St.Groth, D.Graham; Austr.J.Expt.Biol.Med. 27, 83 (1949)

8.) Gottschalk,A., P.E.Lind, Brit.J.Expt.Path. 30, 85 (1949)

9.) Gottschalk,A., "The chemistry and biology of sialic acids and related substances" Cambridge University Press 1960

10.) Hirst,G.K., J.Expt.Med. 75, 49 (1942a)

11.) Hirst,G.K., J.Expt.Med. 76, 195 (1942b)

12.) Hoska,V., Biken's Journal 2, 367 (1959)

13.) Hoyle,L. J.Hyg. 50, 229 (1952)

14.) Kuhn,R., R.Brossmer, Chem.Ber. 89, 2013 (1956)

15.) R.Kuhn,R.Brossmer, Angew.Chem. 70, 25 (1958)

16.) Lauffer,M., M.Wheatley, Arch.Biochem.Biophys.32,436 (1951)

17.) Lindey,H., J.Am.Chem.Soc. 77, 4927 (1955)

18.) Mayron,L.W., M.E.Rafelson; Fed.Proc. 19, 408 (1960)

19.) Mayron,L.W., B.Robert, R.S.Winzler; Arch.Biochim.Biophys. 92, 475 (1961)

20.) Michael,S., F.White,Ch.Anfinsen, Science 125, 691 (1957)

21.) Mohr, E., Dissertationsarbeit 1959 Tübingen

22.) Moore,St., W.H.Stein, J.Biol.Chem. 21, 907 (1954)

23.) Rosenberg,A., B.Binnie, E.Chargaff, J.Am.Chem.Soc.82,4113 (1960)

24.) Rott,R., persönliche Mitteilung 1961

25.) Schäfer,W., in The Viruses, Vol. 1.

26.) Schäfer,W., W.Zillig; Z.Naturforschg., 9b, 779 (1954)

27.) Schramm,G., E.Mohr, Nature 183, 1677 (1959)

28.) Schramm,G., W.Zillig, Z.Naturforschg. 10b, 493 (1955)

29.) Schuster,H., G.Schramm, W.Zillig, Z.Naturforschg.11b,339(56)

30.) Stone,D.S., Austr.J.Expt.Biol.Med. 27, 229 (1949)

31.) Tyrell,D.F., J.Expt.Med. 99, 321 (1954)

32.) Westphal,O., O.Lüderitz, F.Bister; Z.Naturforschg. 7b, 148 (1952)

33.) White,F., J.Biol.Chem. 235, 383 (1960)

Lebenslauf

Ich, Beatriz Gómez, bin als viertes Kind von Arturo Gómez und seiner Ehefrau, Genoveva, geb. Garcia, in Montemorelos, N.L. Mexico, am 4.April 1932 geboren. Von September 1939 bis Juni 1943 besuchte ich eine Privatschule. Nach bestandener Prüfung auf der Primarschule setzte ich mein Studium auf der Secundarschule fort. Bis Juni 1946 besuchte ich dann die "Escuela Secundaria Antonio de la Garza Garcia" in Montemorelos. Mein Bachillerato (ungefähr dem deutschen Abitur gleichbedeutend) machte ich an der Technischen Hochschule in Monterrey N.L. Ende Juni 1949. Nach 8 Semestern begann ich mit der Diplomarbeit. Diese lag auf dem Gebiet der synthetischen organischen Chemie und handelte über "Synthesis of dl-N-(4-Hydroxyphenylacetyl)-5-iodo-4-acetoxy-3-metoxyphenylalanine Methyl Ester". Diese Arbeit wurde publiziert in: J.Am.Chem.Soc. 77, 1288 (1955). Von März bis Oktober 1956 weilte ich in Heidelberg. Dort habe ich im Chemischen Institut unter Dr.Cramer mit einer Doktorarbeit begonnen, doch musste ich aus familiären Gründen nach Mexico zurückkehren. Von September 1957 bis Juni 1958 war ich wissenschaftliche Assistentin an der Technischen Hochschule in Monterey. In der Zeit von Februar 1959 bis Mai 1961 fertigte ich am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen, unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.G.Schramm, meine Doktorarbeit an.